

DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO

NON INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS

DR. SEBASTIÁN ILLANES L., DR. EMILIANO PERTOSI A., DRA. MARÍA ISABEL GONZÁLEZ Z. (1)

1. Departamento de Obstetricia y Ginecología y Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile.

Email: sillanes@uandes.cl

RESUMEN

El estudio no invasivo del material genético fetal es hoy en día una realidad. Mediante el uso de tecnología de avanzada, se puede actualmente determinar el grupo Rh fetal, el sexo fetal y trastornos genéticos fetales. El NIPD (Non Invasive Prenatal Diagnosis) ha generado revuelo en la comunidad científica debido a las grandes perspectivas que se abren desde el punto de vista del manejo de las pacientes. En este artículo se presenta el desarrollo que ha tenido el NIPD y sus aplicaciones clínicas actuales.

Palabras clave: Diagnóstico prenatal no invasivo, NIPD, DNA libre fetal, cffDNA.

SUMMARY

Nowadays, the non invasive study of fetal genetic material is a reality. By using advanced technology, you can now determine fetal Rh group, fetal sex, and determine fetal genetic disorders. NIPD (non invasive prenatal diagnosis) has generated a stir in the scientific community due to the great prospects opening up from the point of view of patient management. In this review you can see the development that has taken the NIPD and current clinical applications.

Key words: Non invasive prenatal diagnosis, NIPD, fetal DNA, cffDNA.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de tener acceso de manera no invasiva al material genético fetal ha sido un objetivo largamente anhelado por aquellos que se dedican a la medicina fetal. Los enfoques que se han utilizado para la obtención de este material se han basado principalmente en (I) la detección de células nucleadas fetales en sangre materna; (II) el aislamiento de elementos celulares del trofoblasto fetal desde el canal endocervical; y (III) el análisis de material genético del feto presente en el plasma materno. En esta revisión se intentará resumir el desarrollo que ha tenido el Diagnóstico Prenatal No Invasivo o NIPD (por sus siglas en inglés) y su aplicación en el manejo clínico de las pacientes.

Células fetales en la sangre materna

Se sabe que las células fetales están presentes en la sangre materna desde hace muchos años, sin embargo su utilización en clínica ha sido decepcionante. Una de las principales razones de la falta de éxito en su utilización para NIPD es el hecho de que las células fetales constituyen una pequeña proporción de la población total de células en sangre materna, estimándose que a las 12 semanas, hay aproximadamente una célula fetal en circulación materna por cada 10.000 a 1.000.000 de células maternas, lo que se traduce en que solamente existen +/- 20 células fetales en 20 ml de sangre materna (1). Esto asociado a la falta de técnicas que logren aumentar la separación de estas células, hacen por el momento inviable esta forma de diagnóstico prenatal (2).

Células trofoblásticas en muestras de cuello uterino

Un enfoque alternativo a la detección de células fetales nucleadas en el plasma materno, es la detección de células trofoblásticas en el canal endocervical o en el moco cervical por medio de irrigación o aspiración. Las células trofoblásticas recuperadas en muestras transcervicales se han utilizado con éxito para el diagnóstico prenatal fetal del genotipo Rh (D) y en algunas alteraciones genéticas, como las que causan talasemia y anemia falciforme (3). Sin embargo, hay algunos problemas que deben ser resueltos antes de que esta técnica pueda ser usada para el diagnóstico prenatal en clínica. Uno de ellos es la marcada variación en la proporción de células fetales encontradas en el canal endocervical, la cual oscila en diferentes informes entre un 4 y 80%. Esta diferencia, depende principalmente del método utilizado para recuperar las células (riesgo o aspiración transcervical de moco cervical) y la variabilidad dependiente del operador (4). Un segundo problema es que esta técnica es al menos mínimamente invasiva. Sin embargo, las pacientes que han sido sometidas a este procedimiento no refieren mayor incomodidad, siendo comparable a la toma de un frotis cervical (4).

Ácidos nucleicos fetales libres en sangre materna

En la última década se ha mostrado la presencia de ácidos nucleicos fetales libres en el plasma materno (cffDNA por su sigla en inglés) (5) y este fenómeno ha sido rápidamente utilizado en el manejo clínico de las pacientes. El origen de estas moléculas presentes en el plasma materno no es un tema completamente resuelto, pero hoy en día, existen pruebas contundentes que apoyan la idea de que la placenta es la principal fuente de cffDNA (4) producto de la apoptosis de células trofoblásticas, con la consecuente liberación de ácidos nucleicos fetales a la circulación materna.

La persistencia de células fetales en la sangre materna y médula ósea (6) generó preocupación en un principio, debido a que el cffDNA detectado en plasma materno pudiera corresponder a embarazos previos. Sin embargo, la evidencia actual confirma que el ADN fetal circulante se elimina rápidamente de la sangre materna a las pocas horas de ocurrido el parto (7-11). Por otro lado, se sabe que la vida media del cffDNA es muy corta y por lo tanto, debe existir una fuente continua de este material durante el embarazo. Además, la ausencia de falsos positivos que mostraron persistencia del ADN fetal (de un embarazo anterior) en los estudios, es una prueba contundente de que no hay problemas para usarlo en embarazos posteriores (12,13).

Aplicación clínica

Predicción del fenotipo Rh fetal en plasma materno

La determinación prenatal del grupo sanguíneo fetal D, en embarazos con riesgo de enfermedad hemolítica perinatal es de suma importancia (14), debido a la morbilidad fetal y neonatal, causada por aloanticuerpos maternos dirigidos contra antígenos presentes en glóbulos rojos fetales que son heredados del padre (15). Para la predicción del grupo sanguíneo fetal, se utilizó inicialmente material fetal obtenido del líquido amniótico. Sin embargo, este procedimiento implica un riesgo de pérdida fetal (16) y hemorragia materno-fetal (17)

que, a su vez, se asocia con un aumento de la incidencia de inmunización materna (18), lo cual hace que este procedimiento sea menos que ideal.

Considerando que la administración de anti-D profiláctico para todas las mujeres D (-) que tienen un parto de un feto Rh (D) positivo, es la base de la prevención de la enfermedad hemolítica perinatal (EHPN), la identificación de las pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad a través del *screening* durante el embarazo, es un paso fundamental en la pirámide de detección y manejo de esta patología. Se ha utilizado el cffDNA en el plasma de mujeres embarazadas para la determinación del genotipo Rh fetal. Esto es relevante, ya que si el feto es Rh (-) no se encuentra en riesgo y por ende no requiere monitoreo ni administración de anti-D (19). Por otro lado, si el feto es positivo, un manejo apropiado del embarazo puede ser planificado. En algunos países el estudio del genotipo de Rh fetal en plasma materno ha permitido el *screening* de todas las mujeres Rh (-) con lo que se logra la administración profiláctica de anti-D sólo a aquellas mujeres que lo necesiten. En Suecia, en 2013, Tibald y colaboradores estimó la incidencia de inmunización Rh luego de la implementación de este *screening* y concluyó que reduce de manera significativa la incidencia de nuevas inmunizaciones Rh (20). En Inglaterra, Soothill y colaboradores estudió la precisión de la genotipificación de Rh fetal usando cffDNA de plasma materno a distintas edades gestacionales y determinó, con buen nivel de evidencia, que la evaluación del Rh es lo suficientemente precisa en la identificación del grupo *rhesus* a las 11 semanas (21), lo que permite la instauración de futuras recomendaciones. El mismo grupo de estudio publicó en agosto de este año los resultados de la implementación del *screening* para el uso profiláctico de anti-D, mostrando una disminución de un 29% en la administración innecesaria de profilaxis en mujeres Rh (-), lo que equivale a un 35% de mujeres Rh (-) de su grupo de estudio (22).

Además, cuando la paciente está sensibilizada, sólo se realizará un seguimiento para determinar si presenta o no anemia moderada o severa con ecografía Doppler (en base a la determinación de un aumento en el *peak* de velocidad sistólico de la sangre fetal en la Arteria Cerebral Media, ACM) en aquellos casos en que el feto sea Rh (+). Varios estudios han usado el Doppler de la ACM como la base clínica de la predicción de anemia en pacientes en riesgo, sin evidencia ecográfica de *hidrops* fetal, mostrando una buena correlación con la hemoglobina fetal (22). El resultado neonatal en quienes el estudio invasivo fue evitado (basándose en el estudio de la velocidad de *peak* de la ACM) no resultó en amenaza de la vida fetal o morbilidad neonatal (23). El uso rutinario del Doppler de la ACM impide el uso innecesario de un estudio invasivo en fetos en riesgo (24).

Predicción del sexo fetal en plasma materno

La detección de secuencias específicas del cromosoma Y en plasma materno (5), ha sido reproducida en muchos laboratorios, siendo un procedimiento exitoso en la determinación del sexo del feto en etapas tempranas del embarazo, logrando un diagnóstico correcto, incluso a los 14 días posteriores a la concepción, con una precisión cercana al 100% al final del primer trimestre (13,25,26). Estos resultados tienen

sin duda un gran impacto en la práctica clínica para el tratamiento de los trastornos genéticos ligados al cromosoma X. Es posible determinar el sexo fetal en etapas muy tempranas del embarazo, incluso antes de realizar una biopsia de vellosidades coriales y así poder guiar la terapia fetal en caso de riesgo de deficiencia de la 21-hidroxilasa (26-28), donde un tratamiento temprano de los embarazos afectados con fetos femeninos puede reducir el grado de virilización de los genitales externos y al mismo tiempo suspender el tratamiento con dexametasona en el caso de que el feto sea masculino (29).

En el caso de condiciones ligadas al cromosoma X, se puede determinar el sexo del feto a través del estudio de cfDNA, reservando pruebas invasivas sólo para comprobar si un feto de sexo masculino se ve afectado o no por la enfermedad. En embarazos con riesgo de padecer una enfermedad ligada al cromosoma X, el estudio no invasivo del sexo fetal, junto con ultrasonido, han mostrado reducir el uso de *test* diagnósticos invasivos en alrededor de un 50% (29).

Trastornos genéticos

El cfDNA es cada vez más utilizado para el NIPD de trastornos genéticos. Trastornos autosómicos dominantes como la distrofia miotónica (30) y Enfermedad de Huntington (31), o mutaciones en un único gen, como la acondroplasia (32), son ejemplos de la amplia gama de enfermedades que pudieran ser diagnosticadas mediante esta técnica. En los casos de trastornos autosómicos recesivos, como la fibrosis quística (FQ), el diagnóstico prenatal en la actualidad requiere de una biopsia de vellosidades coriales. Puesto que hay muchas mutaciones diferentes que pueden causar esta enfermedad en particular, el diagnóstico de un feto no afectado podrá hacerse mediante la exclusión de la presencia de la mutación heredada del padre en el plasma materno. De este modo, el diagnóstico prenatal invasivo podría limitarse a los embarazos en que se ha heredado la mutación paterna y por ende un feto potencialmente afectado (33). Otra forma común de trastorno autosómico recesivo de un único gen es la β -talasemia, la cual puede ser excluida a través de pruebas que determinen la transmisión de la mutación paterna (34).

En el caso de aneuploidías como el Síndrome de Down, la única forma de diagnosticar una trisomía fetal es cuantificando el aumento de señal dado por el cromosoma extra 21 con respecto a la señal de los otros cromosomas en donde no existe la trisomía. Esto se conseguiría con concentraciones muy altas de ADN libre fetal en plasma materno, pero no con la concentración que actualmente se encuentra de 5% aproximadamente (29). Sin embargo, en los últimos años, distintos grupos comerciales han perseverado en la búsqueda de nuevas técnicas moleculares que permitan diseñar un *test* no invasivo prenatal que logre determinar fetos en alto riesgo de presentar una aneuploidía. Es importante destacar esto último ya que el NIPD aún debe ser visto como una técnica de tamizaje, ya que sólo puede afirmar un riesgo aumentado de presentar una aneuploidía, que para su confirmación se requerirá necesariamente de un estudio invasivo (35). Esto ha llevado a que tanto la ACOG como ACMG hayan aprobado y recomendado

utilizar el NIPD como un método de *screening*, orientado principalmente en madres mayores de 35 años y como método previo a un estudio invasivo (36).

La técnicas utilizadas hoy en día para NIPD son principalmente dos: el *Massively Parallel Shotgun Sequencing* (MPSS), que secuenciaría fragmentos de ADN del genoma completo; y la secuenciación dirigida (*targeted sequencing*), que busca sólo secuencias seleccionadas en las regiones de interés del genoma (37). En el *shotgun sequencing*, se obtienen alrededor de 10 millones de secuencias cortas de ADN “tags” o fragmentos (25-36 bp de longitud), que luego se categorizan por cromosoma y se crea un mapa de los denominados *reads* con los cromosomas de interés, los cuales son posteriormente comparados con uno o más de las referencias de cromosomas normales. Si la cantidad de una secuencia específica excede el límite de lo normal (disomía), es que existe una trisomía de ese cromosoma. En esta técnica, el esfuerzo no se hace para distinguir el ADN materno del fetal, ya que el ADN de la madre es la mayoría de la muestra, sino para evaluar la diferencia, aunque sea pequeña, que genera la trisomía fetal, ya que si existe un feto con trisomía, habrá un 50% más de material genético por el cromosoma extra, resultando en un aumento específico de ese cromosoma en el plasma materno (37). Este método podría eventualmente ser aplicado para detectar aberraciones genéticas en cualquier lugar del genoma, lo que también puede significar una desventaja si se detectan zonas que no son relevantes para el NIPD y que tienen hallazgos que no son interpretables (29).

En la secuenciación dirigida (*targeted sequencing*) se genera un sistema de captura capaz de enfocarse en regiones específicas del genoma (38), lo que permite aumentar la cobertura de la región seleccionada de manera importante (39). Hasta la fecha, las publicaciones muestran extremadamente buenos resultados para predicción de trisomía 21 y 18 cuando la secuenciación es exitosa (sensibilidad y especificidad cercanas al 100%). Sin embargo, continúa existiendo un porcentaje entre 1-10% (dependiendo del proveedor del servicio) en el cual no se obtienen resultados y que obliga a una segunda secuenciación (29).

Posibles fuentes de error

1. Edad gestacional temprana: La cantidad de ADN libre fetal en sangre materna aumenta en paralelo con la edad gestacional. Por lo tanto, si las muestras son tomadas en embarazos muy tempranos, la tasa de falsos negativos podría aumentar y no se recomiendan antes de las 10 semanas (40).
2. Obesidad materna: La proporción de ADN fetal en plasma materno se ve afectado por varias características, incluyendo el peso de la madre. El aumento del peso se asocia con menos porcentaje de cfDNA, por lo que debe ser considerado en la consejería de las pacientes (40).
3. Embarazos múltiples: En embarazos monocoriales ambos fetos se verían afectados. Sin embargo, en embarazos bicoriales puede haber discordancia y de esta forma la evaluación del ADN del plasma materno puede no ser tan sencillo.
4. Mosaicismo placentario: La placenta es la fuente de ADN libre fetal

en plasma materno. En algunos casos, se ha estudiado la presencia de trisomía de células placentarias pero con fetos normales que requieren un estudio invasivo.

5. Condiciones maternas: Anormalidades cromosómicas maternas, incluyendo moisaicmos o enfermedades malignas pueden también alterar los resultados (29).

Implementación clínica del NIPD

La ACOG (41) publicó su opinión respecto al tema en 2012, en la cual sugiere que el estudio de cffDNA materno no debe ser ofrecido a mujeres de bajo riesgo. Sugiere indicarlo en las siguientes circunstancias:

1. Edad materna mayor a 35 años
2. Riesgo aumentado de aneuploidía por ultrasonido
3. Embarazo previo con trisomía
4. *Test de screening* positivo o traslocación parental balanceada que signifique un riesgo aumentado de trisomía fetal.

En resumen, se debe ofrecer NIPD sólo como *test de screening* en población de alto riesgo. En febrero de 2013 (42), la guía canadiense recomendó que NIPD, para las trisomías 21, 18 y 13, debería ser una opción disponible para el *screening* de mujeres con riesgo aumentado, pero que debiera realizarse un estudio invasivo si resultara positivo. En abril de 2013 (43), la Sociedad Internacional de Diagnóstico Prenatal publicó su postura, en la cual propuso que el NIPD debe ser considerado en mujeres de alto riesgo identificadas por *screening* previo.

Por último, desde el punto de vista de la implementación clínica de esta tecnología, se abren nuevas perspectivas para los niños con Síndrome de Down. El diagnóstico precoz durante el embarazo de un feto con Síndrome de Down, puede permitir la instauración de medidas terapéuticas que atenúen las consecuencias que significa

para ese individuo el tener un cromosoma 21 extra. Existe un cúmulo de investigaciones que plantea la factibilidad de tratamientos *in utero* de esta condición, aún experimentales en modelos animales, que han buscado reparar las diferentes anormalidades funcionales presentes en el Síndrome de Down. Se plantean tres estrategias principales: implantación de células madre neurales (44-46); enriquecimiento ambiental y ejercicio físico (47-53); y farmacoterapia (54-57,63-73). Estas estrategias han mejorado el aprendizaje y la memoria así como alteraciones electrofisiológicas y moleculares en animales afectados (58-62,64). Se han probado ocho moléculas en ensayos clínicos con humanos, aunque aún no se han realizado pruebas en niños. Los estudios revelan que las alteraciones cerebrales permanentes se originan durante la vida fetal en el Síndrome de Down. El diagnóstico prenatal temprano ofrece una ventana de 28 semanas para impactar de manera positiva en el desarrollo del cerebro y mejorar el resultado cognitivo postnatal en los individuos con esta condición. Algunos de estos enfoques se han utilizado para tratamientos experimentales de ratones *in utero*, los cuales han mostrado efectos terapéuticos que persistieron hasta la edad adulta (74).

Finalmente, el estudio de cffDNA es una técnica que ha cobrado relevancia dentro de la medicina fetal en los últimos años. Por este motivo, grandes esfuerzos en investigación se realizan en la actualidad para lograr su implementación y obtener beneficios para las pacientes. Dentro de estos, destaca la genotipificación de fetos para determinar estado *rhesus*, lo cual podría permitir una profilaxis dirigida a aquellas madres Rh (-) con fetos Rh (+), reduciendo los esfuerzos y aumentando la costo-efectividad de esta estrategia. Por otro lado, su implementación en el *screening* de T21 también confiere beneficios ya que ha mostrado un valor predictivo positivo mayor que el *screening* habitual (45,2% versus un 4,2% para T21) (76). Así, un pronto diagnóstico podría entregar la posibilidad futura de realizar intervenciones antenatales que mejoren las perspectivas de vida de estos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, et al. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenatal Diagnosis*. 2000; 20:886-889.
2. Jackson L. Fetal cells and DNA in maternal blood. *Prenat Diagn* 2003; 23: 837-46.
3. Adinolfi M, Sherlock J. Fetal cells in transcervical samples at an early stage of gestation. *J Hum Genet* 2001; 46: 99-104.
4. Daryani YP, Barker GH, Penna LK, Patton MA. Transcervical sampling as a means of detection of fetal cells during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 752-4.
5. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
6. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 705-708.
7. Lo YMD, Zhanf J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM: Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-224.
8. Johnson-Hopson CN, Artlett CM. Evidence against the long-term persistence of fetal DNA in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2002; 111: 575.
9. Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E, et al. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2003; 112: 617-8.
10. Kolialexi A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Mavroua A Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 113-8.
11. Benachi A, Steffann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, Dumez Y, Costa JM. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet* 2003; 113: 76-9.
12. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Gynecol Obstet Fertil* 2002; 30: 953-7.
13. K.M. Finning, P.G. Martin, P.W. Soothill and N.D. Avent, Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079-1085.
14. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004; 87: 225-32.
15. National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 41. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women. London: NICE, 2002.
16. Nanal R, Kyle P, Soothill PW. A classification of pregnancy losses after invasive prenatal diagnostic procedures: an approach to allow comparison of units with a different case mix. *Prenat Diagn* 2003; 23: 488-92
17. Tabor A, Bang J, Nørgaard-Pedersen B: Feto-maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. *Br J Obstet Gynecol* 1987; 94: 528-34
18. Murray JC, Karp LE, Williamson RA, Cheng EY, Luthy DA. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am J Med Genet* 1983; 16: 527-34.
19. Illanes S, Soothill P. Noninvasive approach for the management 9. of hemolytic disease of the fetus. *Expert Rev Hematol* 2009; 2: 577-82.
20. Tiblad E, Taune Wikman A, Ajne G, Blanck A, Jansson Y, et al. Targeted Routine Antenatal Anti-D Prophylaxis in the Prevention of RhD Immunisation - Outcome of a New Antenatal Screening and Prevention Program. *PLoS One* 2013 6;8(8):e70984.
21. Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K, et al. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ*. 2014 Sep 4.
22. Soothill P, Finning K, Latham T, Wreford-Bush T, Ford J, Daniels G. Use of cffDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG*. 2014 Aug 21.
23. Abdel-Fattah SA, Shefras J, Kyle PM, Cairns P, Hunter A, Soothill PW. Reassuring fetal middle cerebral artery doppler velocimetry in alloimmunised pregnancies: neonatal outcomes without invasive procedures. *Fetal Diagn Ther* 2005; 20: 341-5.
24. Abdel-Fattah SA, Soothill PW, Carroll SG, Kyle PM. Middle Cerebral artery Doppler for the prediction of fetal anaemia in cases without hydrops: a practical approach. *Br J Radiol* 2002; 75 : 726-30
25. Illanes S, Soothill P. Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenat Diagn* 2010; 30 : 668-73.
26. Lo YM, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-75.
27. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 374-8.
28. Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 1135-6
29. Costa JM, Benachi A, Gautier E New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med* 2002; 346: 1502.
30. Royal College of Obstetricians & Gynaecologist. Non-Invasive prenatal testing for chromosomal abnormality using maternal plasma DNA. Scientific impact paper N° 15, March 2014
31. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 301-2.
32. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR. *Neurology* 2003; 60: 1214-5.
33. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000; 356: 1170.
34. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946-8.

35. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002; 360: 998-1000.
36. Errol R. Norwitz, Brynn Levy. Noninvasive prenatal testing: The future is now. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*. Vol 6 N°2, 2013. Pag 52
37. Deborah A. Driscoll, Susan J. Gross.. Screening for fetal chromosomal abnormalities. ACOG Committee on Practice Bulletins (Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects *Obstet Gynecol*. 2007 Jan;109(1):217-27. ACOG Practice Bulletin No. 77:
38. Errol R. Norwitz, Brynn Levy. Noninvasive prenatal testing: The future is now. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*. Vol 6 N°2, 2013. Pag 53.
39. Yuk Ming Dennis Lo. Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Open Biology*, 2012; 2:120086.
40. Andrew B. Sparks, Erick T. Wang, Craig A. Struble, Wade Barrett, Renee Stokowski, Celeste McBride, et al. Selective analysis of cell free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenatal Diagnosis*, 2012, 32.
41. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Prenat Diagn. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013 Jul;33(7):662-6.
42. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics, Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-4.
43. Langlois S, Brock JA, Wilson RD, Audibert F, Carroll J, Cartier L, et al. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada Committee Opinion No. 287. Current status in non-invasive prenatal detection of Down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J Obstet Gynaecol Can* 2013;35:177-81.
44. International Society for Prenatal Diagnosis. Position Statement from the Aneuploidy Screening Committee on Behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, April 2013. Charlottesville, VA: International Society for Prenatal Diagnosis; 2013 [http://ispdhome.org/public/news/2013/PositionStatementAneuploidy4apr2013.pdf]
45. Kern DS, Maclean KN, Jiang H, et al. Neural stem cells reduce hippocampal tau and reelin accumulation in aged Ts65Dn Down syndrome mice. *Cell Transplant* 2011; 20:371-379.
46. Rachubinski AL, Crowley SK, Sladek JR Jr, et al. Effects on neonatal neural progenitor cell implantation on adult neuroanatomy and cognition in the Ts65Dn model of Down syndrome. *PLoS One* 2012; 7:e36082.
47. Rachubinski AL, Maclean KN, Evans JR, Bjugstad KB. Modulating cognitive deficits and tau accumulation in a mouse model of aging Down syndrome through neonatal implantation of neural progenitor cell. *Exp Gerontol* 2012; 47:723-733.
48. Martinez-Cue C, Baamonde C, Lumbreras M, et al. Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* 2002; 134:185-200.
49. Dierssen M, Benavides-Piccione R, Martinez-Cue C, et al. Alterations of neocortical piramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cereb Cortex* 2003, 13:758-764.
50. Martinez-Cue C, Rueda N, Garcia E, et al. Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 2005; 163:174-185.
51. Baamonde C, Martinez-Cue C, Florez J, Dierssen M. G-protein-associated signal transduction processes are restored after postweaning environmental enrichment in Ts65Dn, a Down syndrome mouse model. *Dev Neurosci* 2011; 33:442-450.
52. Chakrabarti L, Scafidi J, Gallo V, Haydar TF. Environmental enrichment rescues postnatal neurogenesis defect in the male and female Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Dev Neurosci* 2011; 33:428-441.
53. Llorens-Martin MV, Rueda N, Tejeda GS, et al. Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neuroscience* 2010; 171:1228-1240.
54. Kida E, Rabe A, Walus M, et al. Long-term running alleviates some behavioral and molecular abnormalities in Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Exp Neurol* 2013; 240:178-189.
55. Guedj F, Sebric C, Rivals I, et al. Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* 2009; 4:e4606.
56. De la Torre R, De Sola S, Pons M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol Nutr Food Res* 2013.
57. Shichiri M, Yoshida Y, Ishida N, et al. Alpha-Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 2011; 50:1801-1811.
58. Lockrow J, Prakasam A, Huang P, et al. Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Exp Neurol* 2009; 216:278-289.
59. Costa AC, Scott- McKean JJ, Stasko MR. Acute injections of the NMDA receptor antagonist memantine rescue performance deficits of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome on a fear conditioning test. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33:1624-1632.
60. Rueda N, Llorens-Martin M, Florez J, et al. Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Alzheimers Dis* 2010; 21:277-290.
61. Lockrow J, Boger H, Bimonte-Nelson H, Granholm AC. Effects of long-term memantine on memory and neuropathology in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* 2011; 221:610-622.
62. Siddiqui A, Lacroix T, Stasko MR, et al. Molecular responses of the Ts65Dn and Ts1Cje mouse models of Down syndrome to MK-801. *Genes Brain Behav* 2008; 7:810-820.
63. Nguyen CD, Costa AC, Cios KJ, Gardiner KJ. Machine learning methods predict locomotor response to MK-801 in mouse models of Down syndrome. *J Neurogenet* 2011; 25:40-51.
64. Lobaugh NJ, Karaskov V, Rombough V, et al. Piracetam therapy does not enhance cognitive functioning in children with Down syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001; 155:442-448.
65. Heller JH, Spiridigliozzi GA, Crissman BG, et al. Safety and efficacy of rivastigmine in adolescents with Down syndrome: a preliminary 20-week, open-label study. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2006; 16:755-765.
66. Prasher VP, Sachdeva N, Adams C, Haque MS. Rivastigmine transdermal patches in the treatment of dementia in Alzheimer's disease in adults with Down syndrome-pilot study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2013; 28:219-220.

67. Spiridigliozzi GA, Heller JH, Crissman BG, et al. Preliminary study of the safety and efficacy of donepezil hydrochloride in children with Down syndrome: a clinical report series. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:1408-1413.
68. Kishnani PS, Heller JH, Spiridigliozzi GA, et al. Donepezil for treatment of cognitive dysfunction in children with Down syndrome aged 10-17. *Am J Med Genet A* 2010; 152A:3028-3035.
69. Blehaut H, Mircher C, Ravel A, et al. Effect of leucovorin (folinic acid) on the developmental quotient of children with Down's syndrome (trisomy 21) and influence of thyroid status. *PLoS One* 2010; 5:e8394.
70. Ellis JM, Tan HK, Gilbert RE, et al. Supplementation with antioxidants and folinic acid for children with Down's syndrome: randomised controlled trial. *BMJ* 2008; 336:594-597.
71. Lott IT, Doran E, Nguyen VQ, et al. Down syndrome and dementia: a randomized, controlled trial of antioxidant supplementation. *Am J Med Genet A* 2011; 155A:1939-1948.
72. Myrelid A, Bergman S, Elfvik Stromberg M, et al. Late effects of early growth hormone treatment in Down syndrome. *Acta Paediatr* 2010; 99:763-769.
73. Boada R, Hutaff-Lee C, Schrader A, et al. Antagonism of NMDA receptors as a potential treatment for Down syndrome: a pilot randomized controlled trial. *Transl Psychiatry* 2012; 2:e141.
74. Hanney M, Prasher V, Williams N, et al. Memantine for dementia in adults older than 40 years with Down's syndrome (MEADOWS): a randomised, doubleblind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012; 379:528-536.
75. Guedj F, Bianchi DW, Delabar JM. Prenatal treatment of Down syndrome: a reality? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014. Apr;26(2):92-103.
76. Diana W. Bianchi, M.D., R. Lamar Parker, M.D., Jeffrey Wentworth, M.D., Rajeevi Madankumar, M.D., Craig Saffer, M.D., Anita F. Das, et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *NEJM* Feb 2014.

Los autores declaran no tener conflictos de interés, en relación a este artículo.